



УДК 591.145.2:543.422:547.96.03

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИНОКСАНТИНА
В АКТИВНОЙ ФОРМЕИлетнев В. З., Старовойтова Н. В., Чупова Л. А.,
Ефремов Е. С.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Методами УФ-спектроскопии, флуоресценции и КД получены спектральные характеристики молекулы хромофора противоопухолевого белка актиноксантина в активной форме. Проведено сопоставление полученных данных с соответствующими параметрами хромофора гомологичного холобелка — неокарциностаина.

Биохимические исследования серии гомологичных противоопухолевых антибиотиков белковой природы, продуцируемых актиномицетами рода *Streptomyces*, — неокарциностаина, макромомицина и ауромомицина — показали, что проявление активности непосредственно связано с присутствием в белке нековалентно-связанного небелкового хромофора (см., например, [1—3]). Природа хромофора была частично установлена для неокарциностаина, наиболее биохимически изученного белка этой серии [4]. Молекулярная масса молекулы хромофора 661; его химическая структура включает производное нафталинкарбоновой кислоты и модифицированный остаток галактозы, разделенные углеводородной цепью. Изучение неокарциностаина и ауромомицина методами оптической спектроскопии позволили выявить сходные черты химической структуры хромофоров обоих белков [3, 5].

В настоящем сообщении приведены данные спектральных исследований еще одного противоопухолевого антибиотика белковой природы — актиноксантина, выделенного в активной форме из микроорганизмов *Actinomyces globisporus* [6]. По своим биологическим свойствам и аминокислотной последовательности он близок к названным выше белкам [6—8].

Рентгеноструктурные исследования актиноксантина в неактивной апоформе с разрешением 2,5 Å установили наличие в пространственной структуре молекулы ярко выраженной полости [9]. При этом было предположено, что полость служит местом расположения хромофора в активном комплексе. В этой связи любая информация, касающаяся химической и пространственной структуры хромофора, может быть полезной в плане изучения его взаимодействия с белком и в первую очередь оценки возможностей его оптимальной укладки в молекулярной полости. С целью исследования хромофорного фрагмента актиноксантина были изучены его спектры УФ поглощения, флуоресценции и КД.

В спектре поглощения холоформы актиноксантина (рис. 1) по сравнению с апоформой отчетливо проявляется поглощение хромофора в области 300—370 нм. Примерно в этом же диапазоне (320—380 нм) поглощает хромофор неокарциностаина [10]; при этом в обоих случаях поглощения хромофорных групп близки ($\epsilon(3-5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Поглощение в указанной области, вероятно, связано с наличием в хромофоре производной нафталинкарбоновой кислоты. Поглощение в районе 280 нм обусловлено ароматическими остатками в белке.

В спектре эмиссии актиноксантина проявляет флуоресценцию с максимумом при 420 нм (рис. 2а), характеризующуюся небольшим квантовым выходом ($\sim 0,016$). Неокарциностаин флуоресцирует примерно при тех

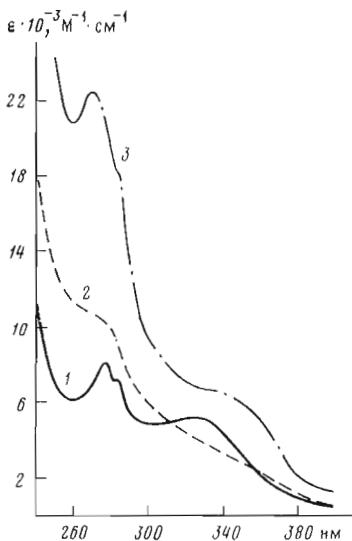


Рис. 1

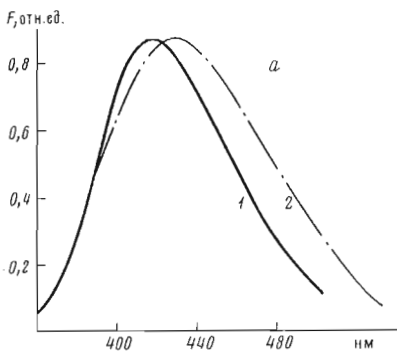


Рис. 1. УФ-спектры поглощения актиноксантина в холо- (кривая 1, концентрация белка $8,4 \cdot 10^{-5}$ М) и ано- (кривая 2; $4,3 \cdot 10^{-5}$ М) формах и неокарциностаина в холоформе (кривая 3; $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, $0,015$ М NaOAc, pH 4,5 [10])

Рис. 2. Флуоресцентные спектры эмиссии с $\lambda_{\text{возб}} 340$ нм (а) и возбуждения с $\lambda_{\text{эмиссии}} 420$ нм (б) холо-белков: актиноксантина (кривая 1; $7,5 \cdot 10^{-5}$ М) и неокарциностаина (кривая 2; $2,0 \cdot 10^{-5}$ М, $0,015$ М трисе, pH 8,0 [10])

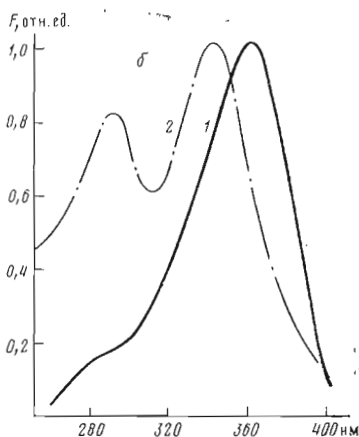


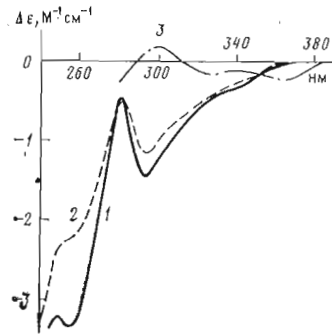
Рис. 2

же длинах волн, но максимум его флуоресценции, так же как и в спектре УФ-поглощения, несколько сдвинут в красную область.

В флуоресцентном спектре возбуждения актиноксантина основная полоса с максимумом при 360 нм примерно соответствует пику при 330 нм в УФ-спектре поглощения (рис. 2б). Различия, по-видимому, обусловлены тем, что приводимые флуоресцентные спектры некорректированы. Небольшое плечо в области 290 нм отвечает, вероятно, вкладу в общую флуоресценцию эмиссии от остатков тирозина. В неокарциностаине этот вклад заметно больше, вероятно, вследствие более интенсивной флуоресценции от остатков триптофана (в актиноксанине остатки триптофана отсутствуют). Результаты спектральных исследований неокарциностаина [10] показывают, что при увеличении эмиссионной длины волны положение максимума основной полосы в его спектре возбуждения смещается в длинноволновую сторону. Это указывает на гетерогенную природу флуоресценции неокарциностаина, что, вероятно, связано с наличием флуоресцирующей примеси. Подобный эффект в полученных нами спектрах актиноксантина не обнаружен.

Однозначная интерпретация спектра КД актиноксантина затруднительна (рис. 3). Отсутствие достаточно интенсивных наведенных эффектов Коттона в области поглощения хромофора является, вероятно, следствием его достаточно свободной посадки в белке или его удаленности от участков полипептидной цепи с регулярной структурой. Сравнимой с актиноксантином оптической активностью в этой же спектральной области обладает и неокарциностаин. Следует отметить относительно высокие значения эл-

Рис. 3. Спектры КД актиноксантина в холо- (кривая 1; $7,5 \cdot 10^{-5}$ М) и апо- (кривая 2; $4,3 \cdot 10^{-5}$ М) формах и неокарциностатина в холоформе (кривая 3; $3,5 \cdot 10^{-4}$ М, 0,015 М NaOAc, pH 4,5 [10])



линичности в ароматической области спектра (280—300 нм) у актиноксантина по сравнению с неокарциностаатином. Одной из причин повышения эллиптичности в спектре актиноксантина может быть более жесткая фиксация ароматических ядер в пространственной структуре белка.

В целом сопоставление спектральных параметров актиноксантина и неокарциностаатиона указывает на определенное сходство природы хромофоров обоих белков. Это, по-видимому, в первую очередь связано с наличием в их химической структуре общей части — производной нафталинкарбоновой кислоты.

Экспериментальная часть

Выделение актиноксантина проводилось по методике [7] с дополнительным использованием изофокусирования в борат-полиольной системе.

Спектры поглощения были получены на спектрофотометре «Beckman» (США), спектры флуоресценции — на флуоресцентном спектрофотометре «Hitachi MPF-3» (Япония) и спектры КД — на дихрографе «Roussel-Jouan III» (Франция).

Спектры записывали при 20° С. Измерения проводили в кюветках толщиной 1 см с использованием $(4,3-8,4) \cdot 10^{-5}$ М растворов актиноксантина в 0,015 М натрий-ацетатном буфере при pH 4,3. Квантовый выход оценивали по стандартному раствору хинисульфата в 0,1 н. H_2SO_4 , для которого его принимали равным 0,56.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kappen L. S., Napier M. A., Goldberg I. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 1970-1974.
2. Beerman T. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, № 3, p. 908-914.
3. Suzuki H., Miura K., Kumada Y., Takeuchi T., Tanaka N. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 94, № 1, p. 255-261.
4. Albers-Schönberg G., Dewey R. S., Hensen O. D., Liesch J. M., Napier M. A., Goldberg I. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 3, p. 1351-1356.
5. Edo K., Katamine S., Kitame F., Ishida N., Koide Y., Kusano G., Nozoe S. J. Antibiotics, 1980, v. 33, № 3, p. 347-351.
6. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Koloditskaya T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Fomina I. P. J. Antibiotics, 1969, v. 22, № 11, p. 541-544.
7. Хожлов А. С., Черчес В. З., Решетов П. Д., Смирнова Г. М., Колодицкая Т. П., Сорокина И. Б., Прокопцева Т. А., Рябова И. Д., Смирнов В. В., Навашин С. М., Фомина И. П. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1970, № 5, с. 755-763.
8. Khokhlov A. S., Reshetov P. D., Chupova L. A., Cherches B. Z., Zhigis L. S., Stoyachenko I. A. J. Antibiotics, 1976, v. 29, № 10, p. 1026-1034.
9. Pletnev V. Z., Kuzin A. P., Trakhanov S. D., Kostetsky P. V. Biopolymers, 1981, v. 20 (in press).
10. Napier M. A., Holmquist B., Strydom D. J., Goldberg I. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 89, № 2, p. 635-642.

Поступила в редакцию
12.VIII.1981

SPECTRAL STUDIES ON ACTINOXANTHIN IN ACTIVE FORM

PLETNEV V. Z., STAROVOITOVA N. V., CHUPOVA L. A.,

EFREMOV E. S.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Spectral characteristics of the chromophore group of the antitumor protein actinoxanthin in the active form have been obtained by UV spectroscopy, fluorescence and CD methods and compared with the corresponding parameters of the chromophore in neocarzinostatin, a homologous holo-protein.